

ОБРАЗОВАНИЕ ПЕРОКСИНИТРИТА НЕЭНЗИМАТИЧЕСКИ ГЛИКОЗИЛИРОВАННЫМИ АМИНОКИСЛОТАМИ И БЕЛКАМИ

Адамчук Р.И., Коновалова Н.В., Пилецкая Т.П., Рогачевский А.А.,
Степура И.И.

Институт биохимии НАН Беларуси, г. Гродно

Glycosylated amino acids and glycosylated human serum albumin reduce nitrite to nitric oxide under anaerobic conditions. The generation of NO increased with an increase in content of colored "final" products of amino acid and serum albumin glycosylation in the incubation mixture.

The prolonged thiamine incubation with glucose and amino acids was accompanied by oxidative transformation of thiamine and formation of products.

The rate of thiamine oxidative transformations was especially enhanced in the presence of glycosylated amino acids and nitrite.

We identified these products as thiochrome and oxodihydrothiochrome using a spectral-fluorescent method and paper chromatography. We have shown that thiamine is also oxidized into thiochrome and oxodihydrothiochrome under the action of peroxynitrite.

The data obtained suggest that in the presence of NO or the NO-donating compounds glycosidated amino acids form peroxynitrite due to the reaction between nitrogen oxide and the superoxide anion.

Keywords: glycosylated amino acids, glycosylated human serum albumin, peroxynitrite, nitric oxide, nitrite, superoxide anion, thiamine, thiochrome, oxodihydrothiochrome.

Токсические эффекты повышенных концентраций глюкозы при сахарном диабете во многом связаны с формированием стабильных кетоаминов и других аддуктов, образующихся при неэнзиматическом гликозилировании остатков лизина и аминокрупп аминокислотных остатков N-конца полипептидной цепи. Время жизни сывороточного альбумина около 21 дня, а гемоглобина примерно 120 дней. В течение этого времени протекают процессы неэнзиматического гликозилирования белков.

Мы проводили изучение процессов неэнзиматического гликозилирования аминокислот и белков путем их длительной инкубации с глюкозой.

В спектре поглощения гликозилированных аминокислот и белков возрастает оптическая плотность в области 250-400 нм. Аминокислоты, гликозилирующиеся с наибольшей скоростью, обладают, соответственно, и наиболее интенсивным поглощением в длинноволновой области. Вклад карбонильной группы продукта Амадори в поглощение (область спектра больше 300 нм) наиболее высок в белке с небольшой степенью гликозилирования и легко может быть определен после ее восстановления борогидридом натрия. Затем доля продуктов Амадори при дальнейшем гликозилировании уменьшается и возрастает количество окрашенного продукта, обладающего интенсивной флуоресценцией с максимумом на 420 нм.

Но и в этом случае в смеси окрашенных гликозилированных продуктов присутствуют карбонилсодержащие соединения [1].

Продукты гликозилирования аминокислот или альбумина являются эффективными донорами электронов и восстанавливают метHb или ферри-цитохром *c* в соответствующие ферро-формы. Увеличение в инкубационном растворе концентрации гликозилированных аминокислот приводит к ускорению восстановления метHb или ферри-цитохрома *c*. Причем, наблюдается достаточно хорошая корреляция также и между временем предварительной инкубации глюкозы с аминокислотой и возрастанием скорости восстановления ферри-форм гемопroteинов [1].

Восстановление нитрита до оксида азота гликозилированными аминокислотами и гликозилированными белками.

После смешивания и инкубации гликозилированной аминокислоты или гликозилированного альбумина с нитритом в сосуде Варбурга в анаэробных условиях наблюдали восстановление нитрита и выделение оксида азота, выход которого количественно регистрировали по образованию нитрозоHb. Из сосуда Варбурга оксид азота диффундировал в кювету, содержащую раствор дезоксиHb, и связывался с ферро-катионом гема.



Следовательно, гликозилированные аминокислоты и гликозилированный альбумин восстанавливают нитрит до оксида азота.

В присутствии кислорода наблюдается перенос электронов от гликозилированных аминокислот или белка не только на молекулы нитрита, но и на молекулы кислорода с образованием супероксиданионов и пероксида водорода. Образование пероксида водорода сопровождается поглощением растворенного в воде кислорода, и в герметично закрытых кюветах или сосудах концентрация кислорода быстро снижается. Показателем обескислороживания водных растворов является также переход оксиHb в дезокси-форму после инкубации с гликозилированными

аминокислотами в герметично закрытых сосудах. После насыщения растворов кислородом, путем встряхивания на воздухе, дезоксиНв оксигенируется заново, практически полностью. Полученные данные позволяют предположить, что в присутствии нитрита и гликозилированных аминокислот будет образовываться пероксинитрит вследствие протекания реакции между оксидом азота и супероксиданионом. Об образовании пероксинитрита свидетельствует окисление тиамин в тиохром и оксидигидротиохром после его инкубации с гликозилированными аминокислотами и нитритом.

Образование тиохрома и оксидигидротиохрома после инкубации тиамин с гликозилированными аминокислотами и NaNO_2 в атмосфере воздуха

Аминокислоты смешивали с глюкозой, нитритом, тиамином и затем инкубировали при 37°C различные промежутки времени. В инкубационной смеси наблюдали окисление тиамин и образование флуоресцирующих продуктов.

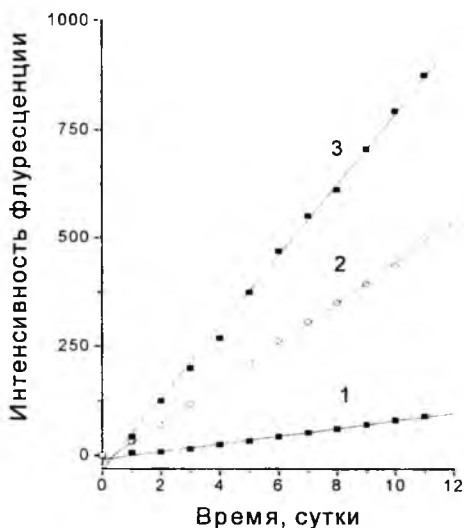


Рис. 1. Кинетика образования флуоресцирующего продукта при инкубации смеси, содержащей тиамин - валин - D-глюкозу - нитрит для различных концентраций нитрита. Концентрация нитрита: 1. - $1.5 \cdot 10^{-3}$ М; 2. - $1.5 \cdot 10^{-2}$ М; 3. - $3 \cdot 10^{-2}$ М. Максимум флуоресценции при 440 нм.

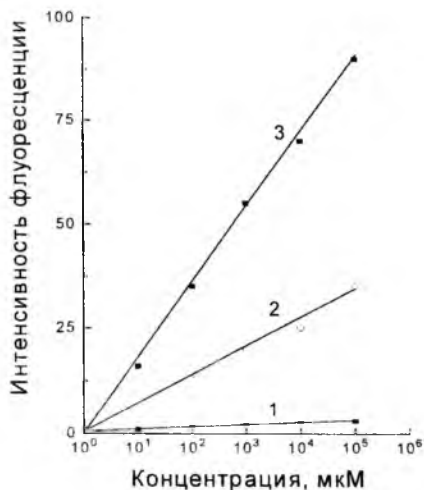


Рис. 2. Зависимость образования флуоресцирующих продуктов от концентрации тиамин в растворе, содержащем глюкозу, валин и нитрит. Время инкубации: 1. – 1 сутки; 2. – 7 суток; 3. – 11 суток. Концентрация нитрита и валина 0,01 М, глюкозы - 1 М. Максимум флуоресценции при 440 нм.

В отсутствие в инкубационной смеси нитрита окисление тиамин было незначительным.

Выход флуоресцирующих продуктов зависит от содержания кислорода в газовой атмосфере. В отсутствие кислорода, или совсем не наблюдали образования флуоресцирующих продуктов, или выход был крайне низким. Максимальный выход флуоресцирующих продуктов наблюдали после инкубации гликозилированных аминокислот с тиамин и нитритом в атмосфере воздуха.

Таким образом, для окисления тиамин в тиохром необходимо одновременно присутствие в водном растворе NO и O_2^- .

Добавление СОД снижало выход флуоресцирующих продуктов примерно на порядок. Это также свидетельствует о вовлечении в процессы окисления тиамин супероксиданионов.

Разделение продуктов трансформации тиамин проводили методом хроматографии на бумаге (смесь этанол-бутанол-вода.) В качестве реперных соединений (стандартов) использовали тиохром, оксодигидротиохром, оксотиохром, которые были синтезированы по методам, описанным ранее [2].

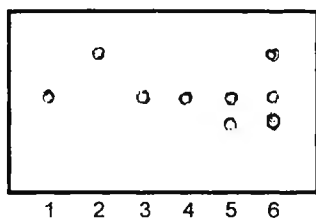


Рис. 3. Хроматографическое разделение продуктов трансформации тиамин, полученных действием гликозилированных аминокислот и нитрита при длительной инкубации. 1.- тioxром (стандарт) ($R_f = 0,68$), 2.- оксидигидротиохром (стандарт) ($R_f = 0,85-0,86$), 3.- тioxром + NaNO_2 ($R_f = 0,68$), 4.- тioxром + глюкоза ($R_f = 0,68$), 5 - тioxром + гликозилированный метионин ($R_f = 0,28$, $R_f = 0,68$), 6 - глюкоза + метионин + тиамин + NaNO_2 после 12 суток инкубации ($R_f = 0,28$, $R_f = 0,68$, $R_f = 0,85$).

Как видно из полученных данных при инкубации тиамин с гликозилированными аминокислотами и нитритом образуются флуоресцирующие продукты – тioxром и оксидигидротиохром.

Образование тioxрома, оксидигидротиохрома после воздействия пероксинитрита на тиамин

При воздействии пероксинитрита на тиамин образуются флуоресцирующие продукты, которые хроматографическим методом идентифицированы как тioxром и оксидигидротиохром. Пероксинитрит получали по известному методу [3]. Если концентрация тиамин в растворе была выше чем концентрация пероксинитрита, то в качестве основного продукта трансформации тиамин образовывался тioxром. При избытках пероксинитрита по отношению к тиамину образуется как тioxром, так и оксидигидротиохром. Тioxром также окислялся пероксинитритом в оксидигидротиохром. Последний был устойчивым к действию пероксинитрита.

Эффективность окисления тioxрома пероксинитритом выше, нежели тиамин.

Выход флуоресцирующих продуктов окисления тиамин снижался в присутствии тирозина, нитрозоглутатиона. Как известно, пероксинитрит эффективно взаимодействует с тирозином с образованием нитротирозина, который является маркерным соединением и свидетельствует о наличии в среде пероксинитрита. Мы наблюдали образование оксидигидротиохрома как при воздействии пероксинитрита на тиамин, так и после инкубации тиамин с гликозилированными аминокислотами. Это свидетельствует об образовании в инкубационной смеси нитрита с гликозилированными аминокислотами пероксинитрита. Следует отметить, что инкубация тиамин в смеси с глюкозой, нитритом и тирозином не сопровождалась

образованием оксодигидротиохрома. Мы предполагаем, что тирозин выступает в качестве ловушки для пероксинитрита.

Другие аминокислоты, такие как триптофан и пролин, также ингибировали образование оксодигидротиохрома. Феррицианид, пероксид водорода не приводят к образованию оксодигидротиохрома.

Заключение

При инкубации нитрита с гликозилированными аминокислотами образуется оксид азота.

Максимальный выход оксида азота, вследствие восстановления нитрита гликозилированными аминокислотами, наблюдали в анаэробных условиях. В присутствии кислорода выход оксида азота снижается вследствие взаимодействия с супероксиданионами и образования пероксинитрита.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ, грант БОЗМС-058.

Литература

1. Степура И. И., Чайковская Н.А., Водоевич В.П., Виноградов В.В. Биохимия, (1999) т. 64 с. 106-110.
2. Степура И. И. (1992) Вопросы мед. химии, т. 38, № 4, с. 26-33.
3. Koppenol, W.H., Kissner, R., and Beckman, J.S. (1996) Methods Enzymol., 269, 296-302.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СУПЕРОКСИДАНИОНОВ С РИБОФЛАВИНОМ. РОЛЬ РИБОФЛАВИНА В СТАБИЛИЗАЦИИ УРОВНЯ ОКСИДА АЗОТА И НИТРОЗОТИОЛОВ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Адамчук Р.И., Степура А.И.

Институт биохимии НАН Беларуси, г. Гродно

The oxidized form of riboflavin effectively interacts with organic free radicals and super-oxide anions to produce a leuko-form. It can be easily oxidized by air oxygen or ferri-forms of hemoglobin and Cyt. c, to form riboflavin and hydrogen peroxide or ferro-forms of heme-containing proteins, respectively. It is proposed, that riboflavin due to the interaction with super-oxide anions can stabilize the nitrogen oxide level in the body.

Keywords: riboflavin, semiquinone and leuko-forms of riboflavin, superoxide anions, ferro- and ferri-forms of Cyt. c, hydrogen peroxide, superoxide dismutase, nitric oxide, ultrasound.